製品コード CY238

食品・環境分析用

TaKaRa

Cycleave®PCR EHEC (O111/O121) Typing Kit

説明書

・測定結果の判定方法に「＋／－判定の基準値」を追加しました。詳細は P9 ～ 10、P14 にてご確認ください。
・Lot. AF4P040 および AK501Z より、製品の容量が 20 回用に変わりました。P3 のキット内容をご確認ください。

v201510Da

O157：H7 や O26 をはじめとする腸管出血性大腸菌（EHEC）は、血便と激しい腹痛を伴う出血性大腸炎、さらには溶血性尿毒症症候群を引き起こす病原性大腸菌の一群です。これらの重篤な症状の原因は、EHEC が産生する細胞毒素であるベロ毒素です。EHEC の検出においては、まずベロ毒素遺伝子の保有状況によるスクリーニングを行い、ベロ毒素遺伝子陽性であれば、O 抗原型の遺伝子タイピングをした上で、分離培養を行う方法が効率的であるとされています。

本キットは、O 抗原型の内、O111 と O121 のタイピングに使用します。本キットには、O111 の O 抗原合成遺伝子領域の遺伝子を検出するための FAM 標識プローブと、O121 の O 抗原合成遺伝子領域の遺伝子を検出するための ROX 標識プローブが含まれています。二波長を同時にモニタリングすることで、一本のチューブで O111 および O121 の検出が可能です。リアルタイム PCR によるタイピングであり、電気泳動が不要で、迅速に結果が得られます。

なお、増幅産物の検出にはサイクリングプローブ法を採用しています。サイクリングプローブ法は、RNA と DNA のキメラプローブと RNase H の組み合わせによる非常に特異性の高い検出法です。
サイクリングプローブは、片方の端が蛍光物質で、もう片方の端がその蛍光物質の発する蛍光を消光する物質（クエンチャー）で標識されています。このプローブは、インタクトな状態ではクエンチングにより蛍光を発することはありませんが、配列が相補的な増幅産物とハイブリッドを形成した後に RNase H により RNA 部分で切断されることにより、強い蛍光を発するようになります。

※ 本製品を用いる検出方法は、厚生労働省通知「腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について」（食安監発 1120 第 1 号）に収載されました。

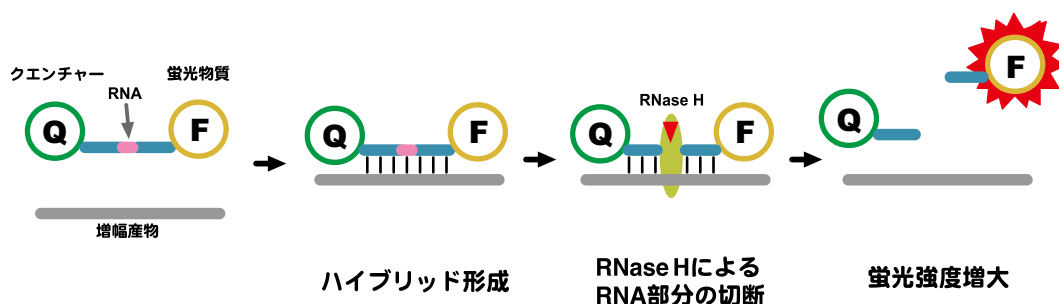



図 1．サイクリングプローブの原理

I.　キットの内容（20回反応分、25 μl反応系）

● 1.	2 × Cycleave Reaction Mixture	2 × conc.	250 μl
● 2.	O111/O121 Primer/Probe Mix＊	5 × conc.	100 μl
○ 3.	dH_2O		1 ml
● 4.	O111 Positive Control		40 μl(8回分)
● 5.	O121 Positive Control		40 μl(8回分)
○ 6.	EASY Dilution (for Real Time PCR)		1 ml

＊：蛍光標識プローブを含んでいますので、遮光に留意してください。

コンポーネント1～3は、製品に添付している小箱を利用し、4～6のコンポーネントとは別に保管してください。

【コンポーネントの説明】

2 × Cycleave Reaction Mixture：
PCR反応試薬です。反応に必要な酵素、Buffer、dNTP Mixtureを含みます。

O111/O121 Primer/Probe Mix：
O111およびO121のO抗原合成遺伝子領域の遺伝子をそれぞれ検出するためのプライマー・プローブ溶液です。O111検出用のプローブはFAM、O121検出用のプローブはROXで標識されています。

dH_2O：滅菌水です。

O111 Positive Control：O111検出用陽性コントロールです。

O121 Positive Control：O121検出用陽性コントロールです。

EASY Dilution (for Real Time PCR)：
Positive Controlを希釈する際に、希釈溶液として使用します。

II.　保存

－20℃（輸送、保存とも）

III. キット以外に必要な機器など（主なもの）

リアルタイム PCR 装置および専用チューブ
Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC（製品コード TP970）
Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies）など
ヒートブロック
DNeasy Blood & Tissue Kit（QIAGEN 社）

200 μl、20 μl、10 μl　各マイクロピペット
マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）
卓上遠心機
微量高速遠心機

IV. 操作上の注意

1. リアルタイム PCR 装置の取扱いは各装置の取扱説明書に従ってください。

2. 万一、キメラプローブやプライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出が出来ません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作は細心の注意を払ってください。

3. 陽性と判定された検体は、さらに微生物学的な手法を用いて確認してください。

4. 反応液の調製から検出まで、次の 3 つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。各エリアにおいては、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。

   ○エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
   ○エリア 2：検体の調製を行います。
   ○エリア 3：検体の反応液への添加と、反応および検出を行います。

   本キットでは増幅反応と検出を同時にリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などに使用する必要はありません。また、コンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。

5. 本キットはリアルタイム PCR 装置での解析によって結果判定を行います。リアルタイム PCR 装置の各種 Auto 機能が適正に働かなかった場合は誤判定の原因になります。必要に応じてリアルタイム PCR 装置の取扱説明書に従い、Manual 設定を行ってください。

V. 操作

操作の概要

1. サンプルの調製
   DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて DNA 抽出を行う。
2. リアルタイム PCR 装置のセッティング
3. 反応液の調製と反応開始
   反応液を調製する。
   ↓
   反応液を反応チューブに分注し、陰性コントロール、または検体サンプル、または陽性コントロールを添加する。
   ↓
   反応チューブをリアルタイム PCR 装置にセットし反応を開始する。
4. 解析

V-1. サンプルの調製（エリア 2 で実施）

食品培養液からの腸管出血性大腸菌の DNA 抽出には、DNeasy Blood & Tissue Kit（QIAGEN 社）を使用します＊。DNeasy Blood & Tissue Kit の説明書に従って操作してください。

＊：通知法に基づいた試験を行う場合には、必ず DNeasy Blood & Tissue Kit を使用してください。それ以外の場合には、NucleoSpin Tissue（製品コード 740952.10/.50/.250）等の同等品を使用することが可能です。

V-2. 反応液の調製と反応開始

反応の種類について

本キットでは、以下の 2 種類の反応を実施します。

＜反応 A：ターゲット遺伝子の検出反応＞
- ターゲット遺伝子（O 抗原領域遺伝子）の検出が目的。
- 検体由来の DNA のみを鋳型として添加する。

＜反応 B：PCR 阻害の有無の確認＞
- PCR 阻害の有無の確認が目的。
- 1/100 希釈した Positive Control の反応に検体由来の DNA を添加する。
- ＜反応 B ＞は、＜反応 A ＞で O111、O121 のどちらの検出においても検体サンプルの増幅曲線が得られなかった場合の判定に用いる。
- VT 遺伝子検出の際に、上記 V-1. サンプルの調製の記載と同じ方法で調製したサンプルを使用し、インターナルコントロール等により PCR 阻害がないことをすでに確認しているサンプルを用いる場合には、＜反応 B ＞は省略することができる。

（1）Positive Control の段階希釈（＜反応 B ＞で使用）（エリア 3 で実施）

O111 Positive Control と O121 Positive Control を EASY Dilution (for Real Time PCR) で 1/100 に段階希釈する。

O111 Positive Control の段階希釈例
1）O111 Positive Control 原液 5 μl ＋ EASY Dilution 45 μl → 1/10 希釈液
2）1）の 1/10 希釈液 5 μl ＋ EASY Dilution 45 μl → 1/100 希釈液

O121 Positive Control も同様に 1/100 に段階希釈する。

（2）下記に示す反応液を氷上で調製する。（エリア 1 で実施）

＜反応 A：ターゲット遺伝子の検出反応＞

検体サンプル等の鋳型以外のコンポーネントを必要本数＋ α 分調製し、各反応チューブに 20 μl ずつ分注して軽くキャップをしめる。その内の 1 本に陰性コントロールとして dH_2O を 5 μl 加え、反応チューブのキャップをしっかり閉める。必要本数は、サンプル数＋ 3 本（陰性コントロール、O111 と O121 の陽性コントロール）とする。

	液量（1 反応）	最終濃度
● 2 × Cycleave Reaction Mixture	12.5 μl	1 ×
● O111/O121 Primer/Probe Mix	5 μl	1 ×
検体サンプル or 陽性コントロール （O111 Positive Control or O121 Positive Control） or dH_2O	（5 μl）＊	
○ dH_2O	2.5 μl	
Total	25 μl	

＜反応 B：PCR 阻害の有無の確認＞

検体サンプル等の鋳型以外のコンポーネントを必要本数＋ α 分調製し、各反応チューブに 20 μl ずつ分注して軽くキャップをしめる。その内の 1 本に陰性コントロールとして dH_2O を 5 μl 加え、反応チューブのキャップをしっかり閉める。必要本数は、サンプル数＋ 1 本（陰性コントロール）とする。

	液量（1 反応）	最終濃度
● 2 × Cycleave Reaction Mixture	12.5 μl	1 ×
● O111/O121 Primer/Probe Mix	5 μl	1 ×
O111 Positive Control 1/100 希釈液	0.5 μl	
O121 Positive Control 1/100 希釈液	0.5 μl	
検体サンプル or dH_2O	（5 μl）＊	
○ dH_2O	1.5 μl	
Total	25 μl	

＊：検体サンプルおよび＜反応 A ＞の陽性コントロール DNA（原液）はステップ（3）で加えるため、ここでは加えません。

【注意】蛍光ノイズの原因になりますので、チューブやふたには素手で触れないようにご注意ください。

（3）サンプル（鋳型）の添加（エリア 3 で実施）

陰性コントロール以外の各チューブに、検体サンプルまたは陽性コントロールを添加し、しっかりふたをする。
反応チューブを卓上遠心機で軽く遠心を行い、リアルタイム PCR 装置にセットする。

【注意】反応液調製後、なるべく 1 時間以内に反応を開始してください。

V-3. リアルタイム PCR 装置による増幅・検出（エリア 3 で実施）

操作の手順は、それぞれのリアルタイム PCR 装置で異なります。詳しい操作方法は、それぞれの機器に添付されている説明書をご確認ください。

通知法には、適合機種として Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900）、Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System、Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies）が収載されています。

【 Thermal Cycler Dice Real Time System の場合 】

食品環境検査用ソフトウェアの≪＋／－判定≫モードでの解析が便利です。操作方法の詳細は、「食品環境検査用ソフトウェア Quick Manual ～定性解析（＋／－判定）用～」（タカラバイオのオンラインカタログで公開）をご参照ください。

＜反応条件設定画面＞

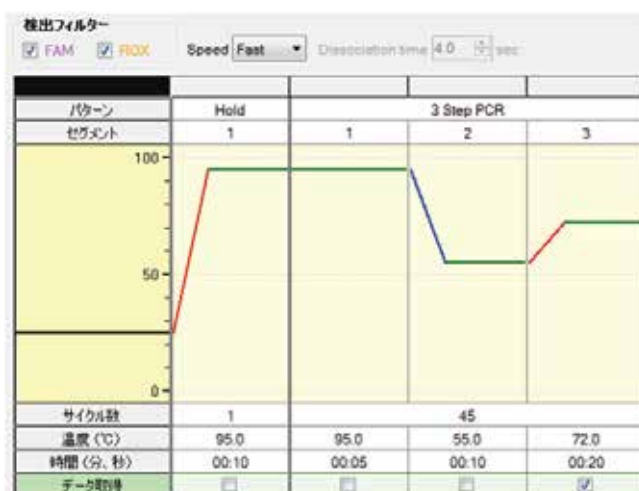
PCR 条件

初期変性（Hold）
Cycle：1
95℃　10 秒

3 step PCR
Cycle：45
95℃　 5 秒
55℃　10 秒
72℃　20 秒（検出）

注：“Speed” は、Thermal Cycler Dice Real Time System III（製品コード TP970）の場合は Normal に、Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900）や *Lite*（製品コード TP700）では Fast に設定します。
食品環境検査用ソフトウェアをご使用の場合、Speed の設定は各装置のデフォルト条件のままなので、設定の変更は不要です。

検出フィルター

FAM
ROX

※ 検出フィルターの設定は＜ FAM、ROX ＞にチェックを入れたままで変更は不要。 温度条件とデータ取得も変更不要。

＜サンプル設定画面＞

<u>検出フィルター</u>

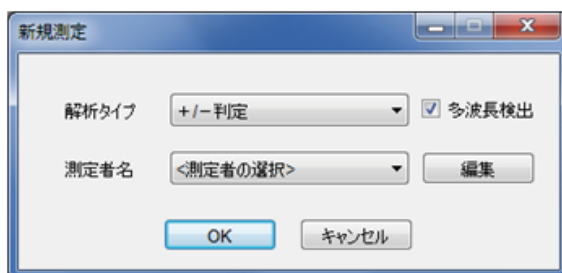
インターナルコントロール：<none>

<u>サンプルタイプ</u>

陰性コントロール
　サンプルタイプ：NC（Negative Control）

陽性コントロール
　サンプルタイプ：PC（Positive Control）

検体サンプル
　サンプルタイプ：UNKN（Unknown）

1. ファイルの新規作成

(1) ファイルを新規作成する。
(2) 解析タイプとして＋／ー判定を選択する。
(3) 多波長検出にチェックを入れる。

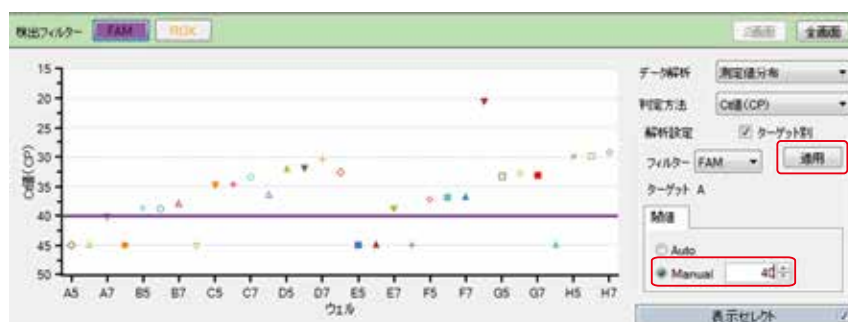
2. ウェル情報設定

(1) インターナルコントロールの設定は <none> のままで変更不要。
(2) サンプルタイプ（NC、PC、UNKN）を選択する。
(3) ターゲット設定のマーク（A、B、C・・・）を選択する。
　使用する製品が 1 種類のみの場合は、すべて A とする。

(4) 必要に応じてサンプル名を設定する。
画面右上の表示切替の「名称」を選択すると、下記のような画面になる。

＜結果／解析画面＞

1. ＋／－判定の閾値の設定

(1) 検出フィルターの FAM ボタンをクリックする。
(2) データ解析のメニューから「測定値分布」を選択する。
(3) 閾値のタブで Manual を選択し、「40」と入力する。
(4) 適用ボタンをクリックする。
(5) ROX についても FAM と同様に設定する。

2. ＋／－判定結果の確認

(1) 検出フィルターの FAM または ROX ボタンをクリックする。
(2) データ解析のメニューから「判定結果」を選択する。
(3) ＋／－の結果を確認し、14 ページの判定表に従って判定する。

【Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System、Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System（Life Technologies）の場合】

各種設定は、Advanced Setup で行ってください。
Experiment Properties にて Quantification-Standard Curve を選択し、TaqMan® Reagents を選択します。

PCR 条件

初期変性（Hold）
Cycle：1
95℃　10 秒

3 step PCR
Cycle：45
95℃　 5 秒
55℃　10 秒
72℃　25 秒（検出）

Passive Reference

（none）

Define Targets

Target Name：O111、Reporter：FAM、Quencher：（none）
Target Name：O121、Reporter：ROX、Quencher：（none）

Define Samples

陰性コントロール
サンプルタイプ：NTC（No Template Control）

陽性コントロールおよび検体サンプル
サンプルタイプ：Unknown

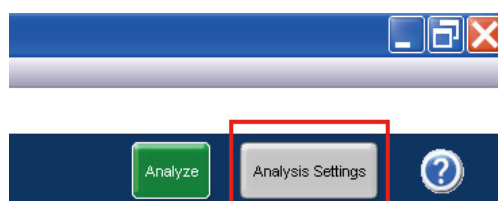
解析終了後、必要に応じて、解析パラメータを Manual 設定で修正してください。

解析終了後、Analysis 画面の Amplification Plot で増幅曲線を確認し、Threshold と Baseline を Manual 設定で適切な位置に修正する。

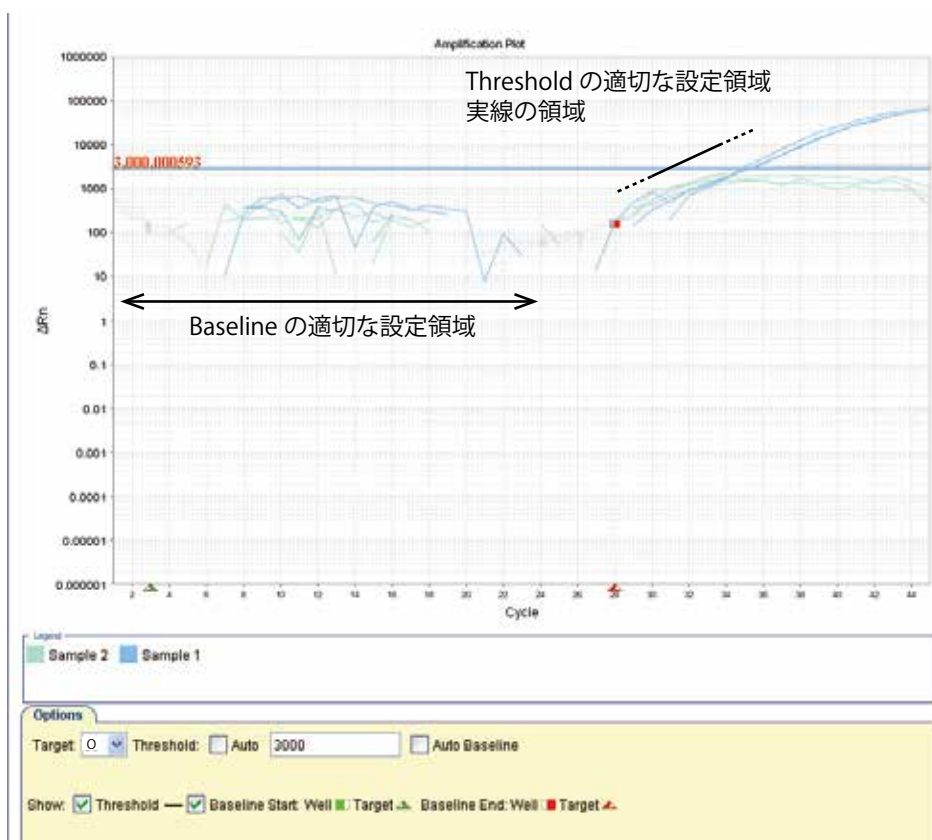
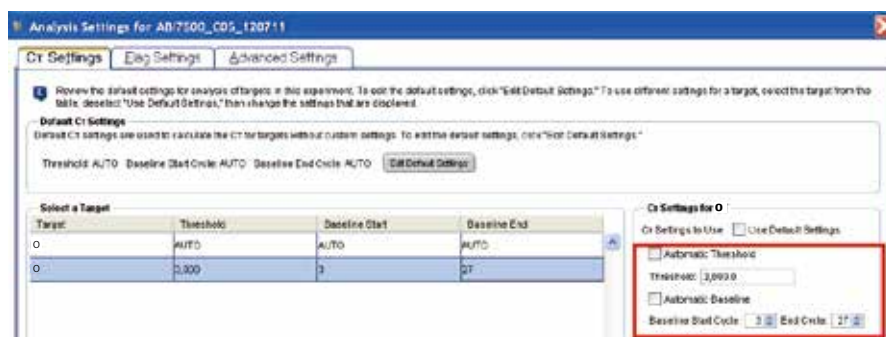
1. Amplification Plot の Options の設定

   Target：のドロップダウンリストから O111、O121 を測定した Target を選択する。
   Threshold：の Auto と Auto Baseline のチェックボックスの☑をはずす。
   Show：の Threshold と Baseline のチェックボックスに☑を入れる。

2. Analysis Setting 画面の表示

   画面右上の Analysis Settings ボタンをクリックする。

3. Analysis Setting 画面での設定

Select a Target で O111、O121 を測定した Target を選択する。
Ct Settings for *Target Name* で Threshold と Baseline の適切な値を設定する＊。
画面下の Apply Analysis Settings のボタンをクリックする。

＊：Threshold は Amplification Plot（Log 表示）が直線になっている範囲内に、Baseline は Amplification Plot の立ち上がりが認められる前までの範囲に設定します（下図参照）。

（参考）StepOnePlus Real-Time PCR System（Life Technologies）も同様な操作です。ただし、StepOnePlus Real-Time PCR System では、ROX の検出感度が低いため、全 target を同時に表示すると、ROX の増幅曲線が小さく表示されます。FAM と ROX の target を別々に表示させて解析してください。

VI. 測定結果の判定について

【＋／－判定の基準】

本製品では、Ct 値が 40 未満の場合に検出（＋）と判定します＊。

検出（＋）　：Ct 値 40 未満の場合
不検出（－）：Ct 値 40 以上または Ct 値が算出されない場合

＊：40 サイクル以降では、非特異的な蛍光値の上昇が起こることがあります。

【正常な測定結果の例】

＜反応 A：ターゲット遺伝子の検出反応＞

・ターゲット遺伝子（O 抗原領域遺伝子）の検出が目的。
・検体由来の DNA のみを鋳型として添加した。

鋳型	O111（FAM）	O121（ROX）	判定結果
dH$_2$O（陰性コントロール）	－	－	正常
O111 Positive Control（陽性コントロール）	＋	－	正常
O121 Positive Control（陽性コントロール）	－	＋	正常
検体サンプル	＋	－	O111 陽性
	－	＋	O121 陽性
	＋	＋	O111 陽性および O121 陽性
	－	－	反応Bより、PCR阻害なしの場合： O111 および O121 陰性 反応Bより、PCR阻害ありの場合： 判定不能

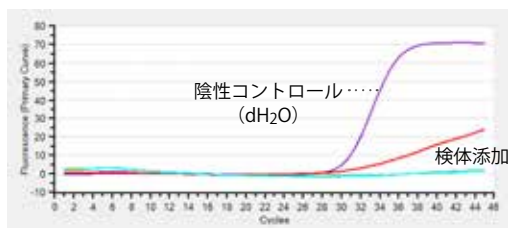
＜反応 B：PCR 阻害の有無の確認＞

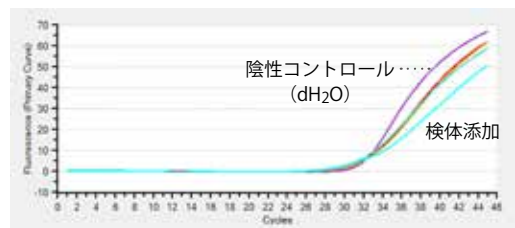
・PCR 阻害の有無の確認が目的。
・1/100 希釈した Positive Control の反応に検体由来の DNA を添加した。

＜反応 A ＞で、O111、O121 のどちらの検出においても検体サンプルの増幅曲線が得られなかった場合の判定に使用する。

添加	O111	O121	判定結果
dH$_2$O（陰性コントロール）	反応性良好	反応性良好	正常
検体サンプル	反応性良好	反応性良好	PCR 阻害なし
	反応性良好	反応性低下	PCR 阻害あり
	反応性低下	反応性良好	PCR 阻害あり（→次頁参照）
	反応性低下	反応性低下	PCR 阻害あり

検体中に含まれる夾雑物による反応阻害の例

O111 検出系（FAM 検出）

陰性コントロール……
（dH_2O）
検体添加

O121 検出系（ROX 検出）

O121 検出系では、検体を添加した場合、陰性コントロール（滅菌水を添加）と同等の反応性を示しましたが、O111 検出系では、検体を添加した場合、陰性コントロールより反応性が低下しました（前頁、反応 B の表の 3 番目の事例に該当）。このような結果になった場合は、PCR 阻害が疑われます。

【 異常な測定結果の例とトラブルシューティング 】

反応 A の陰性コントロール反応

● O111 または／および O121 の検出において増幅曲線が得られた。
→ 試薬中に目的産物が混入した可能性がある。再度、コンタミネーションに注意し反応を行う。

陽性コントロール反応

● 対象となるターゲット遺伝子の増幅曲線が得られなかった。
→ 何らかの原因で PCR 反応、またはサイクリングプローブ検出が正常に行われていない。反応液の調製にミスがないことを確認し、再度反応を行う。

検体の反応

● 検体由来の増幅が認められず、反応 B より PCR 阻害が疑われた。
→ 鋳型に PCR 阻害物質が混入している可能性がある。再度、DNA 抽出をやり直す。

反応 B の陰性コントロール反応

● O111 または／および O121 の検出において増幅曲線が得られなかった。
→ 何らかの原因で PCR 反応、またはサイクリングプローブ検出が正常に行われていない。Positive Control の希釈や反応液の調製にミスがないことを確認し、再度反応を行う。

※ 検体サンプルの判定は、各コントロール反応の結果とあわせて最終判定を行ってください。

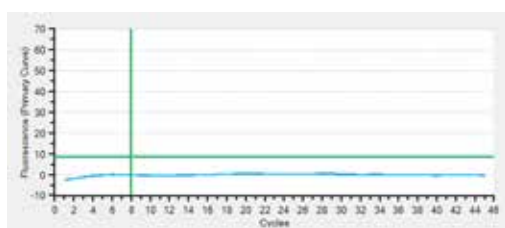
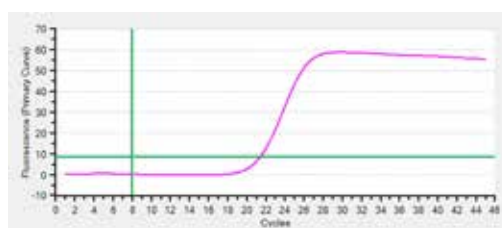
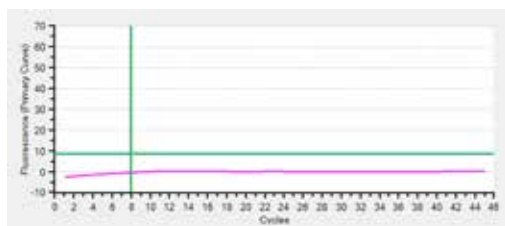
VII. 反応例

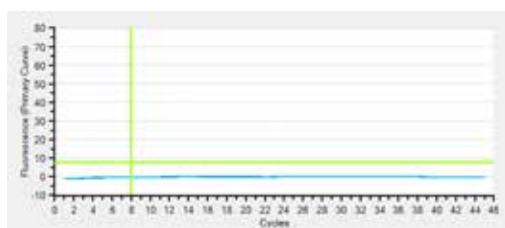
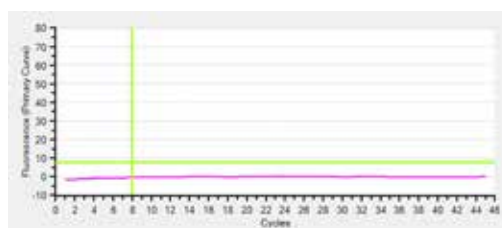
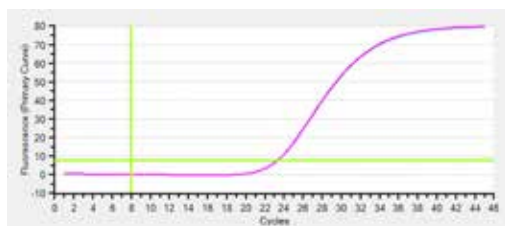
【方法】

陰性コントロールとして dH_2O、陽性コントロールとして O111 Positive Control および O121 Positive Control を鋳型として使用し、V. 操作の記載に従って反応を行った。

【結果】

O111 検出系（FAM フィルター）

陰性コントロール（dH_2O）

O111 Positive Control

O121 Positive Control

O121 検出系（ROX フィルター）

陰性コントロール（dH_2O）

O111 Positive Control

O121 Positive Control

VIII. 関連製品

Cycleave®PCR EHEC (O157/O26) Typing Kit（製品コード CY237）
Cycleave®PCR EHEC (O103/O145) Typing Kit（製品コード CY239）
Cycleave®PCR EHEC (O165) Typing Kit（製品コード CY241）
Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC（製品コード TP970）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
EASY Dilution (for Real Time PCR)（製品コード 9160）
96well Hi-Plate for Real Time（製品コード NJ400）
Sealing Film for Real Time (Adhesive)（製品コード NJ501）
Sealing Film for Real Time（製品コード NJ500）
Plate Sealing Pads（製品コード 9090）
48 well snap plate（製品コード NJ700）
Flat cap for snap plate（製品コード NJ720）
0.1 ml 8-strip tube & cap Set（製品コード NJ903）
0.1 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ902）
0.2 ml Hi-8-Tube（製品コード NJ300）
0.2 ml Hi-8-Flat Cap（製品コード NJ302）
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ600）
0.1 ml 96 well plate for Real Time（製品コード NJ900）

＜ベロ毒素遺伝子の検出＞
Cycleave®PCR O-157 (VT gene) Screening Kit Ver.2.0（製品コード CY217A/B）
EHEC (VT gene) PCR Screening Set（製品コード RR120A）

IX. 注意

・本製品は食品分析および環境分析用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。検査結果判定により発生する問題に関してタカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。
・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
・Cycleave、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の、TaqMan は Roche Diagnostics GmbH の登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999　Fax 077-565-6995
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201510Da